

氏 名	豊 島 拓 樹
学位（専攻分野の名称）	博 士（（バイオサイエンス）
学 位 記 番 号	甲 第 808 号
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 20 日
学 位 論 文 題 目	過酷な環境下から単離された微細藻類の新規な光酸化ストレス 防御メカニズムに関する研究
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・博士（理学） 太 治 輝 昭 教 授・博士（農学） 川 崎 信 治 教 授・博士（農学） 朝 井 計 教 授・農 学 博 士 新 村 洋 一 博士（理学） 小 杉 真貴子*

論文内容の要旨

背景・目的

光合成生物は強光を伴う高塩分や乾燥などの環境ストレス下では、活性酸素種の生成を伴う光酸化ストレスが発生し枯死に至る。所属研究室では一般植物の生育が困難な環境に生育する光合成生物は新規な生命応答を持つ可能性を推定し、優れたストレス耐性能を有する微細藻類の探索と単離を行ってきた。単離株の中で真夏のアスファルトから単離した微細藻類 Ki-4 株は、モデル藻類が枯死する光酸化ストレス下で藻体を赤色化し長期間生存する高い耐性能を示した。この赤色物質は真核の光合成生物では報告例がない水溶性のカロテノイド結合タンパク質に由来することが判明し、本タンパク質はアスタキサンチンを結合することから AstaP と命名された。AstaP は細胞表層移行シグナルを持ち、光酸化ストレス付与後に細胞内で大量に蓄積すること、また水溶液中での¹O₂消去活性を持つことから細胞表層での日焼け防止と活性酸素防御の二機能性を持つタンパク質であることが推定された。一方、Ki-4 株が示す高い光合成回復力や AstaP の発現機構を含む光酸化ストレス耐性の総合的な分子メカニズムは未解明である。そこで本研究では Ki-4 株が光酸化ストレス耐性を獲得する分子プログラムの解明を目的として研究に着手した。

方法・結果

1. Ki-4 株の系統分類学的な種の同定について

Ki-4 株は 18S rRNA 遺伝子に基づいた系統分類から、イカダモ科に属する緑藻であることが推察されたが、種の同定は未着手であった。そこで分子系統学的、および形態学的な解析を行った。18S rRNA 遺伝子及び ITS2 配列解析の結果、Ki-4 株はイカダモ科 (Scenedesmaceae) の *Coelastrella* 属内で独立したクレードを形成した。また微細藻類の分類

*自然科学研究機構 アストロバイオロジーセンター 特任研究員

同定に重要な指標となる細胞形態を光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて観察した結果、既知種とは異なる細胞表層の特徴を示した。以上からKi-4株はイカダモ科に属する新種と決定し、*Coelastrella astaxanthina* Ki-4と命名・受理された。

2. 光酸化ストレス下での光合成回復過程の解析と細胞形態変化の観察

Ki-4株はAstaPに代表されるユニークな光酸化ストレス応答性を示す。そこで光酸化ストレス付与後に観察される光合成活性の回復と細胞形態の変化について解析を行った。Ki-4株は強光が伴う光酸化ストレス（800 $\mu\text{mol photons}$, 0.7 M NaCl）付与直後に光合成反応が急激に低下したが、同ストレス環境下でありながら1時間以内に光合成活性を回復し、18時間後には光合成活性を約60%回復する様子が観察された。その後は1週間にわたり光合成活性を維持しながら肥大化し、最終的に休眠細胞の形態へと変化した。この光合成活性の回復過程で、光酸化ストレス耐性を獲得するための代謝を行うことが推察された。以上の結果から、光合成回復期について、ストレス付与後24時間までを回復期、それ以降を耐性期と2区分した。

3. 光酸化ストレス下でのAstaPタンパク質と補因子アスタキサンチンの生合成

AstaPは光酸化ストレス下で大量に発現することから、Ki-4株の光酸化ストレス防御系の中核を担うタンパク質と推察される。そこでAstaPの発現プロファイルを解析した。その結果、*astaP* 遺伝子は光合成回復期のストレス付与3時間後から顕著な発現誘導を示した。一方、AstaPタンパク質はストレス付与後24時間後から発現・蓄積が観察された。補因子であるアスタキサンチンの新規生合成はストレス付与6時間後から徐々に開始され、その後1週間に渡り増加し続けた。以上の結果、Ki-4株は光酸化ストレス下で、AstaPを光合成回復期ではなく、長期的なストレス耐性に利用するために生産・蓄積することが推察された。興味深いことに、ストレス耐性期の細胞内総カロテノイド含量に占めるアスタキサンチン含有量はルテインより低く、同じ二次カロテノイドであるアドニキサンチンやカンタキサンチンなどと同程度であったことから、AstaPは細胞内でアスタキサンチンを選択的（嗜好的）に結合し、アスタキサンチンを細胞表層に局在化するために機能するタンパク質であることが示唆された。

4. 光酸化ストレス耐性発現の分子プログラム：転写産物と代謝産物の解析

Ki-4 株は光酸化ストレス付与直後に光合成活性を回復するが、その回復を可能とする分子プログラムは不明である。そこで網羅的な転写産物解析を行った。ストレス付与直後から一週間後までの細胞を経時的にサンプリングし、cDNA ライブラリの作製と RNA-seq 解析を行った。その結果、光合成回復期初期のストレス付与 3 時間後に *astaP* を含む数多くの

遺伝子の協奏的な発現変動が観察された。ストレス付与 3 時間後に発現が上昇した遺伝子の上位 30 遺伝子のうち半数以上が機能未知遺伝子と同定されるなど、遺伝子機能からの光合成回復の分子機構予測は困難であった。そこでストレス付与に伴い変化する代謝産物を網羅的、かつ経時的に解析し、回復期に行われるストレス代謝系の同定を目指した。LC/MS と GC/MS を用いたメタボローム解析の結果、ストレス付与直後の顕著な遺伝子発現変動を伴わない時期にスクロースを含む糖組成の変化が観察された。またストレス付与 3 時間以降からは複数の代謝産物の組成変動が観察された。以上の結果から、ストレス付与直後は糖代謝を変動させて一時的に浸透圧の変動を緩和・適応することで、光合成の回復を可能にする分子機構の存在が示唆された。*astaP*を含む遺伝子の協奏的な発現が観察されるストレス付与 3 時間以降からは、二次カロテノイド組成やアミノ酸組成の顕著な変動が観察されたことから、細胞内の主要な代謝産物組成を変化させることで、長期的なストレス耐性を獲得する分子機構の存在が推察された。

5. 光合成解析によるユニークな光エネルギー散逸機構NPQの同定

光合成生物は強光ストレスに対処する手段として光化学系における余剰の光エネルギーを散逸する複数の機構を持つことが報告されているが、Ki-4株では未同定であった。そこでクロロフィル蛍光により光化学系の量子収率や光エネルギーの熱散逸を測定するPAM 蛍光法 (pulse amplitude modulated fluorometry) を用いて、余剰の光エネルギー散逸機構の存在と特徴を明らかにするための解析を行った。解析の結果、Ki-4 株は光を当てた直後に強力な非光化学的消光 (Non-Photochemical Quenching : NPQ, 余剰な光エネルギーを熱として消散するシステム) を誘導し、電子伝達活性の回復と共に数分のうちに解消する様子が観察された。光照射直後の蛍光増加により、NPQが誘導される過程はモデル藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* NIES-2238にも観察されたが、Ki-4株は特に蛍光消光の割合が大きく、その解消も遅いことから、*C. reinhardtii*よりも強力なNPQを所持する可能性が推察された。そこでメカニズムの詳細について知見を得るべく、緑藻および植物の代表的なNPQであるキサントフィルサイクルや、光化学系の電子伝達反応に対する各種阻害剤を用いて解析を行った。一般的な光合成生物は、炭酸固定系の活性が暗条件で抑制され、光照射直後にプラストキノンプールの還元に伴って一時的にクロロフィル蛍光が上昇する。Ki-4株はこの過程でチラコイドルーメンに蓄積されたプロトンにより、強力なNPQが誘導されるメカニズムを持つことが示唆された。

本NPQのKi-4株以外の分布を確認するために、他の微細藻類を用いて観察した。その結果、Ki-4株の近縁種や当研究室で単離された株において類似のNPQが観察された。また、近縁種であってもストレス感受性を示す*Scenedesmus obliquus* SAG 276-3a には同NPQの誘導が観察されず、本NPQは高い光酸化ストレス耐性を示す微細藻類が持つ特徴の1つで

あることが示唆された。

総 括

本研究では、Ki-4 株が示す高い光酸化ストレス耐性能を可能とする分子機構の解明を目的として研究を行った。PAM 解析の結果から、Ki-4 株はストレス付与前から光エネルギーを散逸するためのユニークな NPQ を保持することが示唆された。光酸化ストレス付与直後から 3 時間後までのストレス応答初期には、光合成反応を速やかに停止し、余剰の光は強力な NPQ により熱に変換すると同時に、糖代謝を変動させることで一時的な浸透圧ストレスショックを回避すると推察した。3 時間後からは *astaP* 遺伝子の誘導を含む新規遺伝子群を協奏的に発現し、ストレス耐性に必要な代謝系への切り替えを行って光合成を回復すると共に、アスタキサンチンを含む二次代謝産物の生産を開始した。24 時間以降の耐性期では二次カロテノイド類の生産を継続し、AstaP の蓄積、藻体の赤色化、油滴やデンプンの蓄積などを伴う肥大化が起こり、最終的に細胞がシスト状態へと変化する様子が観察された。代表的なアスタキサンチン生産藻として知られる *Haematococcus pluvialis* では、強光条件下でアスタキサンチン油滴を細胞内部から細胞表層に移行させることで細胞内部を強光から防御する機構が報告されている。つまり藻類がシスト細胞として長期間生存するためには、アスタキサンチンを細胞壁周辺に局在化することは有用であり、Ki-4 株は AstaP を利用することで類似の強光防御効果を実現する可能性が示唆された。また、共同研究者による Ki-4 株のプロテオーム解析の結果、既知の抗酸化タンパク質と共に RNA-seq で同定された機能未知タンパク質の発現誘導や、Rubisco など炭酸固定に必要なタンパク質の減少が観察された。すなわち、Ki-4 株はストレス付与後に成長に必要な代謝を抑制しつつ、ストレス耐性に必要なタンパク質群を発現する分子機構を持つことがタンパク質レベルからも観察された。以上により、Ki-4 株は光合成生物が持つ既知のストレス応答機構と共に報告例のない複数の光酸化ストレス耐性機構を駆動することにより光酸化ストレス耐性を獲得することが示唆された。今後は確立されつつある真核微細藻類の遺伝子改変技術などを用いることで、機能未知遺伝子の機能同定やユニークな NPQ システムの反応に関与するタンパク質の同定を行うことが望まれる。

審 査 報 告 概 要

過酷な生育環境に生息する光合成生物は新規な生命維持機構を持つ可能性を推定し、東京農業大学前の真夏のアスファルト道路から単離した真核微細藻類 Ki-4 株が持つ優れた環境ストレス防御機構の解明を目的として研究を行った。本研究では、Ki-4 株の生物分類を行

い、イカダモ科の新種であることを提唱し、*Coelastrella astaxanthina* Ki-4 として受理された。本藻は光合成生物では報告例のないアスタキサンチンを水溶化するタンパク質 AstaP を保持・蓄積することが最大の特徴であるが、本研究から AstaP が光酸化ストレスに応答・蓄積するメカニズムが推定され、かつ AstaP がアスタキサンチンを細胞内で選択的(嗜好的)に結合する能力を持つことが判明した。また PAM 蛍光法を用いて本藻が光合成生物で類例に乏しい NPQ(非光化学的消光:Non-Photochemical Quenching)を持つことを発見した。本研究の結果、植物生理学的に新規な複数の知見が得られたことから、審査員一同は博士(バイオサイエンス)の学位を授与する価値があると判断した。